

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

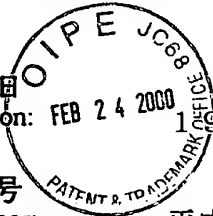
Date of Application: FEB 24 2000 1999年 7月27日

出 願 番 号

Application Number: 平成11年特許願第212703号

出 願 人

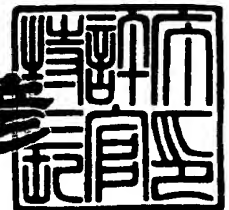
Applicant(s): 松下電器産業株式会社



1999年10月22日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3072506

| | |
|----------|--------------------------------|
| 【書類名】 | 特許願 |
| 【整理番号】 | 2030110002 |
| 【あて先】 | 特許庁長官殿 |
| 【国際特許分類】 | G01N 27/30 |
| 【発明の名称】 | グルコースセンサ |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 大阪府門真市大字門真 1006 番地 松下電器産業株式会社内 |
| 【氏名】 | 湯川 系子 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 大阪府門真市大字門真 1006 番地 松下電器産業株式会社内 |
| 【氏名】 | 吉岡 俊彦 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 大阪府門真市大字門真 1006 番地 松下電器産業株式会社内 |
| 【氏名】 | 南海 史朗 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 香川県高松市古新町 8 番地の 1 松下寿電子工業株式会社内 |
| 【氏名】 | 岩田 潤子 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 香川県高松市古新町 8 番地の 1 松下寿電子工業株式会社内 |
| 【氏名】 | 宮崎 正次 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 香川県高松市古新町 8 番地の 1 松下寿電子工業株式会社内 |
| 【氏名】 | 馬場 英行 |

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10 番 24 号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 竹嶋 誠嗣

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1006 番地

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100072431

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 和郎

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第276153号

【出願日】 平成10年 9月29日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 066936

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9905716

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコースセンサ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 電気絶縁性基板、前記基板上に設けられた少なくとも作用極と対極を有する電極系、および前記電極系に接してまたはその近傍に形成され、少なくともピロロキノリンキノンを経酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼを含む反応層を具備するグルコースセンサであって、

前記反応層が、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を含むことを特徴とするグルコースセンサ。

【請求項 2】 前記グルコースデヒドロゲナーゼが、前記添加剤によって被覆されていることを特徴とする請求項 1 記載のグルコースセンサ。

【請求項 3】 ピロロキノリンキノンを経酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼに、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を配合することを特徴とするグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項 4】 ピロロキノリンキノンを経酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼと、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、

クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤と含むことを特徴とするグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中の特定成分を迅速かつ簡便に高精度で定量することができるグルコースセンサに関する。さらに具体的には、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースセンサ用のグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法、および安定化したグルコースデヒドロゲナーゼ組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来から、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく試料液中の特定成分を簡易に定量する方式として、様々なバイオセンサが提案されている。バイオセンサの一例として、例えば次のようなセンサが知られている（特開平2-062952号公報）。

このバイオセンサは、絶縁性基板上にスクリーン印刷などの方法で作用極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体とを含む酵素反応層を形成することによって作製されるものである。

このようにして作製したバイオセンサの酵素反応層上に基質を含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して酵素と基質が反応し、これにともなって電子受容体が還元される。酵素反応終了後、還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めることができる。

上記のようなバイオセンサによれば、原理的には、測定対象物質を基質とする

酵素を選択することによって、様々な物質の測定が可能である。

例えば、酵素にグルコースオキシダーゼを選択すると、試料液中のグルコース濃度を測定するグルコースセンサを作製することができる。

【0003】

上記のような構成のバイオセンサでは、通常、酵素は、乾燥状態でセンサ内に保持されている。酵素は、蛋白質を主成分とするため、空気中などの水分に長期間接触すると、変性してしまう危険性がある。また、極端な場合、酵素が失活してしまう危険性がある。

そのため、センサを長期間保存すると、酵素の活性が低下して、基質と反応する酵素量が不足してしまい、得られる応答電流値が基質の濃度に比例しなくなる場合がある。

また、通常、基質濃度が0の試料液をセンサ内に導入しても、ある程度のセンサ応答電流値（以下、「ブランク値」という。）が得られる。このブランク値が得られる原因の一つとして、センサ内に導入され、反応層を溶解した試料液に含まれるイオンが、基板上の電極表面に溜まり、電極反応を起こすことが考えられる。このブランク値が大きいと、応答電流値と基質の濃度との相関性が低下する要因となるため、基質の正確な定量ができなくなる。

【0004】

したがって、保存安定性に優れ、ブランク値の小さいバイオセンサを得るためには、酵素の近傍に、酵素の活性が長期間保持されるような環境を整えることが重要である。また、ブランク値が無視できる程度に小さくなるような環境を、基板上の電極表面付近に与えることも重要である。さらに、酵素反応時に電子や基質の移動が円滑に行われるようにし、センサの応答性を高めることも必要である。

上記のような問題点を解決するため、従来は、リン酸などの添加剤を反応層に添加していた。

【0005】

一方、高性能なグルコースセンサを作製するため、従来は、酵素としてピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼ（以下、「PQQー

GDH」という。)を用いていた。PQQ-GDHを用いるグルコースセンサは、PQQ-GDHそのものの触媒反応に酸素が関与しないため、酵素反応が血中などの溶存酸素の影響を全く受けないという特性を有する。そのため、このグルコースセンサによって得られる測定値は、試料液中の酸素分圧によってばらつくことがない。すなわち、高性能なセンサを得ることができる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、酵素としてPQQ-GDHを用いた場合、前述したリン酸などの添加剤を反応層に添加しても、得られるバイオセンサのブランク値を十分に小さくすることができず、また、保存安定性も十分に向上させることができないという問題があった。

本発明は、このような問題点に鑑み、保存安定性が高く、ブランク値が小さい高性能なグルコースセンサを提供することを目的とする。さらに、本発明は、PQQ-GDHの安定化方法、および安定化されたグルコースデヒドロゲナーゼ組成物を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明によるグルコースセンサは、電気絶縁性の基板、前記基板上に設けられた少なくとも作用極と対極を有する電極系、および前記電極系に接してまたはその近傍に形成され、少なくともピロロキノリンキノンを補酵素として結合したグルコースデヒドロゲナーゼを含む反応層を具備するグルコースセンサにおいて、前記反応層に、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を添加することを特徴とする。

ここにおいて、前記酵素が、前記添加剤によって被覆されていることが好ましい。

【0008】

また、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼに、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を配合することを特徴とするグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法にも関する。

【0009】

さらに本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼに、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を配合してなることを特徴とするグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼ組成物にも関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

上記のように、本発明のグルコースセンサは、酵素としてPQQ-GDHを含む反応層に、フタル酸などの添加剤を含ませたものである。

上記のような添加剤、例えばフタル酸水素カリウムとPQQ-GDHの混合溶

液を滴下し乾燥して反応層を形成すると、酵素表面がフタル酸水素カリウムによって取り囲まれるため、温度、湿度、電荷の状態などの環境の変化から酵素を保護することができる。その結果、酵素の活性を長期間安定させることができるのである。

また、前記添加剤は、センサ内に試料液が導入されると溶解してイオン化し、試料液に含まれていたイオンや、反応層の溶解によって生じたイオンに影響を与える。その結果、イオンが基板上の電極表面に溜まらず、ブランク値を小さくすることができることになるのである。

さらに、上記のような添加剤を反応層に含ませると、反応層が水に容易に溶けるため、試料溶液を反応層に添加すると、反応層は直ちに溶解し、酵素反応と電極反応を円滑に進めることができ都合がよい。

【0011】

上記のような効果が期待できる添加剤には、フタル酸、フタル酸水素カリウムなどのフタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸ナトリウムなどのマレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸ナトリウムなどのコハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミン塩酸塩などのトリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸一カリウム、クエン酸カルシウム、クエン酸三カリウム、クエン酸三ナトリウム、クエン酸三リチウム、クエン酸水素二アンモニウム、クエン酸水素二ナトリウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸二アンモニウム、クエン酸二水素カリウム、クエン酸二水素ナトリウム、クエン酸二ナトリウム、クエン酸マグネシウムなどのクエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩などのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンなどがあげられる。

特に、フタル酸水素カリウムを用いると、保存安定性および応答特性に優れ、ブランク値の非常に小さいグルコースセンサを得ることができる。

【0012】

これらの添加剤はすべて緩衝剤として使用することのできる化合物であり、必要に応じて塩酸、酢酸などの酸やNaOH、KOHなどのアルカリにより所定のpHに調整して添加すればよい。好適なpHは、5.0～8.5である。もちろん、ほかの緩衝液にこれらの添加剤を配合したものをを用いてもよい。

また、前記添加剤の添加量としては、PQQ-GDH 250～10000 U/mlに対して5～80 μ Mという範囲であればよく、安定性と低ブランク値であるという理由から、10～50 μ Mであるのが好ましい。なお、Uはunitを表す。

【0013】

本発明の反応層には、酵素反応に伴って還元される電子受容体を含有させてもよい。この電子受容体には、フェリシアン化イオン、p-ベンゾキノンおよびその誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体などを用いることができる。

【0014】

本発明の反応層には、親水性高分子を含有させてもよい。反応層中に親水性高分子を添加することにより、電極系表面からの反応層剥離を防ぐことができる。さらに、親水性高分子は、反応層表面の割れを防ぐ効果も有しており、バイオセンサの信頼性を高めるのに効果的である。

このような親水性高分子としては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジンなどのポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸およびその塩の重合体、メタクリル酸およびその塩の重合体、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩の重合体、アガロースゲルおよびその誘導体が好適に用いられる。

【0015】

バイオセンサ内における反応層は、電気絶縁性基板上に形成された電極系上のほか、本発明の効果を損なわない限り、種々の位置に配置することができる。例

えば、前記基板の電極系上以外の場所にも配置することができる。また、バイオセンサは、カバー部材を含む。このカバー部材は、前記基板に組み合わされて基板との間に前記電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するが、このカバー部材の試料液供給路に露出する面に前記反応層を配置することもできる。

酸化電流の測定方法としては、作用極と対極のみの二電極方式と、参照極を加えた三電極方式があり、三電極方式の方がより正確な測定が可能である。

【0016】

また、本発明は、前述した添加剤を、ピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼに添加することにより、グルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼを安定化する方法にも関する。添加の方法としては、本発明の効果を損なわない方法であれば特に制限はない。

さらに、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼと前記添加剤を含むグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼ組成物にも関する。

【0017】

ここで、本発明の安定化組成物には、前記添加剤に加えて、本発明の効果を損なわない範囲で他の安定化剤を添加しても構わない。

このような安定化剤としては、例えば金属塩、蛋白質、アミノ酸、糖、有機酸、界面活性剤などをあげることができる。

金属塩としては、例えばカルシウム、ストロンチウムおよびマンガンなどのハロゲン化物のほか、これらの硫酸塩、硝酸塩などでもよい。

蛋白質としては、酵素活性に影響を与えないものであるのが好ましく、例えばウシ血清アルブミン（BSA）、卵アルブミン、ゼラチンなどをあげることができる。

アミノ酸としては、例えばリジン、ヒスチジン、グルタミン酸などの一般的なもののほか、グリシルグリシン、ポリリジンなども用いることができる。なかでも、水溶性の高いものが好ましい。

【0018】

糖としては、単糖、二糖、オリゴ糖および多糖など、種類を問わずに用いるこ

とができる。また、これらの誘導体も用いることができる。具体的には、例えばグルコース、フラクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、マルトトリオース、マルトシルサイクロデキストリン、 α -サイクロデストリン、 β -サイクロデキストリン、 γ -サイクロデキストリン、デキストリン、アミロース、グリコーゲン、デンプン、イヌリン、グルコサミン、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、リビトールおよびデオキシグルコースなどをあげることができる。

有機酸としては、例えば α -ケトグルタル酸、リンゴ酸、フマル酸、グルコン酸、コール酸およびデオキシコール酸などがあげられる。

界面活性剤としては、非イオン性のものが好ましい。

その他、ホウ酸、ホウ砂、塩化カリウム、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、グリセロール、フィコール、EDTA、EGTA、DTT、DTE、GSH、2-メルカプトエタノールなどを添加してもよい。

これらの安定化剤の添加量は、グルコースデヒドロゲナーゼ 1.0 重量部に対して安定化剤 0.0001~1.0 重量部が好ましい。

【0019】

上述の添加剤を含み、さらに要すれば前記安定化剤を含む本発明のピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼ組成物は、安価に、しかも酵素の基本性能に悪影響を与えることなくその活性を保持することができる。

また、本発明における補酵素であるピロロキノリンキノンとしては、いずれの起源のものも用いることができる。

【0020】

ここで、ピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼの活性の測定方法について説明する。

試薬としては、50 mMのPIPE S緩衝液、0.2 mMのPMS (pH 6.5)、0.2 mMのNTB、30.6 mMのグルコース、0.19%のトリトンX-100の混合試薬を用いる。

この混合試薬 3 ml を 37℃ で約 5 分間予備加熱した後、0.1 ml の酵素溶液を添加し、緩やかに攪拌する。その後、水を対照として、37℃ に制御した分

光光度計で、その吸光度を5分間記録する。そして、記録された直線部分から1分間あたりの吸光度変化を算出する。また、盲検は、酵素溶液の代わりに蒸留水を前記混合試薬に添加して吸光度を測定することにより行う。

このような方法によって1分間に1/2マイクロモルのジホルマザンを生成する酵素量を1単位(U)とする。

以下に、実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

【0021】

【実施例】

図1は、本発明の一実施例におけるバイオセンサの反応層を取り除いた概略平面図である。ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード2、3を形成している。ついで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して作用極4を形成している。この作用極4は、リード2と接触している。さらに、この基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成している。絶縁層6は、作用極4の外周部を覆っており、これにより作用極4の露出部分の面積を一定に保っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように基板1上に印刷してリング状の対極5を形成している。

図2は、図1のバイオセンサの概略縦断面図である。図1に示すように作製した電極系上に、親水性高分子層7が形成され、この親水性高分子層7の上にPQQ-GDHと添加剤を含む反応層8が形成されている。

【0022】

《実施例1》

図1の基板1の電極上に、親水性高分子であるカルボキシメチルセルロースのナトリウム塩（以下、「CMC」と略す。）の0.5wt%水溶液を滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させ、CMC層7を形成した。続いて、PQQ-GDH 5000ユニットとフタル酸水素カリウム20μMおよびフェリシアニ化カリウム50μMを水1mlに溶解した混合溶液をCMC層7上に滴下し乾燥して、反応層8を形成した。このようにしてグルコースセンサを作製した。

つぎに、試料液として、種々の濃度に調整したグルコース水溶液を調製した。そして、この試料液を反応層 8 上に滴下した。グルコースを含む試料液が反応層に供給されると、試料内のグルコースは PQQ-GDH により酸化される。そして、これと同時に反応層中のフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。

【0023】

試料液を滴下してから 1 分後に、対極 5 を基準にして作用極 4 に +0.5 V の電圧を印加して、フェロシアン化カリウムを酸化した。そして、5 秒後に対極と作用極の間を流れる電流値を測定した。

同様に、種々の濃度のグルコース水溶液に対する電流値を測定し、横軸にグルコース濃度、縦軸に電流値をプロットしてセンサの応答特性図を作成した。その結果を図 3 に示す。

また、同様にして作製したバイオセンサを 6 ヶ月間保存した後、このバイオセンサの応答特性図を作成した。その結果を図 3 に示す。

図 3 より、得られたセンサのブランク値が非常に小さいことがわかる。また、濃度と電流値との間には一定の相関性があり、優れた直線性を示している。

作製直後のセンサと 6 ヶ月保存後のセンサの応答特性にはほとんど差はなく、得られたセンサの保存性が優れていることがわかった。

【0024】

《比較例 1》

フタル酸水素カリウムの代わりに、リン酸カリウムを添加した以外は、実施例 1 と同様にグルコースセンサを作製した。そして、実施例 1 と同様に、作製直後と 6 ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。その結果を図 3 に示す。

このセンサは、図 3 より明らかなように、ブランク値が高く、グルコース濃度が 110 mg/dl よりも低濃度域では、グルコース濃度を反映した真の電流値よりも高い応答電流値を示した。逆に、グルコース濃度が 110 mg/dl よりも高濃度域になると、応答電流値は、実施例 1 よりも低くなり、グルコース濃度と電流値との直線性も低下した。

また、6ヶ月間保存後のセンサは、直線性が作製直後のセンサよりもさらに低下し、得られたセンサの保存性はよくなかった。

【0025】

《比較例2》

フタル酸水素カリウムを加えなかった以外は、実施例1と同様にしてグルコースセンサを作製した。そして、実施例1と同様にして、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。

その結果、得られたセンサのブランク値は、非常に大きく、また、基質濃度が増加しても、応答電流値はあまり増加しなかった。また、6ヶ月間保存後のセンサは、酵素が失活し、基質濃度が増加しても、応答電流値はほとんど増加しなかった。

【0026】

《実施例2》

電極上にCMC層7を形成しない以外は、実施例1と同様にしてグルコースセンサを作製した。そして、実施例1と同様にして、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。

その結果、グルコース濃度と電流値との間には、一定の相関性があり、良好な直線性を有していた。ブランク値も小さかった。また、センサ作製直後と6ヶ月保存後のセンサの応答特性にはほとんど差はなく、良好な保存性を示した。

【0027】

《実施例3～10》

フタル酸水素カリウムの代わりにマレイン酸（実施例3）、こはく酸（実施例4）、トリエタノールアミン塩酸塩（実施例5）、クエン酸2水素ナトリウム（実施例6）、ジメチルグルタル酸（実施例7）、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（実施例8）、トリス（ヒドロキシメチル）グリシン（実施例9）またはトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（実施例10）を添加したほかは、実施例1と同様にしてグルコースセンサを作製し、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。この応答特性図を図4～図11に示す。

図4～図11から、得られたセンサのブランク値が非常に小さく、濃度と電流

値との間に一定の相関性があるのがわかる。また、応答性が高く、良好な直線性を示した。さらに、センサ作製直後と6ヶ月保存後のセンサの応答特性にはほとんど差はなく、良好な保存性を示した。

【0028】

《実施例 11～18》

電極上にCMC層7を形成しないほかは、実施例3～10と同様にしてグルコースセンサを作製し、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。

その結果、グルコース濃度と電流値との間に一定の相関性があり、良好な直線性を示した。得られたセンサのブランク値も非常に小さかった。さらに、センサ作製直後と6ヶ月保存後のセンサの応答特性にはほとんど差はなく、良好な保存性を示した。

【0029】

《実施例 19》

本発明のピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースヒドロゲナーゼ10 U/mlを、1 mMの塩化カルシウムを含む20 mMの各種添加剤（緩衝液）に添加し、37℃で3日間保持し、活性残存率（溶解直後の活性値に対する活性値の割合）を調べた。ただし、リン酸カリウム緩衝液には塩化カルシウムを添加しなかった。

各添加剤中における活性残存率を表1に示す。

【0030】

【表 1】

| 緩衝液の種類 | pH | 残存活性 (%) |
|--------------|------|----------|
| フタル酸水素カリウム | 6. 0 | 1 0 0 |
| マレイン酸 | 6. 5 | 1 0 0 |
| コハク酸 | 6. 0 | 1 0 0 |
| トリエタノールアミン | 7. 0 | 1 0 0 |
| クエン酸二水素ナトリウム | 6. 5 | 1 0 0 |
| ジメチルグルタル酸 | 6. 5 | 1 0 0 |
| トリシン | 7. 5 | 9 5. 4 |
| イミダゾール | 7. 5 | 1 0 0 |
| コリジン | 6. 5 | 9 6. 1 |
| トリス塩酸 | 7. 5 | 6 3. 4 |
| リン酸カリウム | 6. 5 | 4 4. 3 |

【0 0 3 1】

表 1 から、従来から汎用されている緩衝液であるリン酸カリウム緩衝液、トリス塩酸緩衝液に比べて、本発明における添加剤によれば、良好な安定性が得られることがわかる。

【0 0 3 2】

《実施例 2 0》

1 mM の塩化カルシウムおよび B S A を含む各種添加剤（緩衝液）に、本発明のピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースヒドロゲナーゼを溶解した。なお、B S A は、グルコースデヒドロゲナーゼ 1. 0 重量部に対して 0. 3 重量部混合した。得られた溶液を凍結乾燥して 3 7 °C で 1 週間保存した後、その活性残存率（溶解直後の活性値に対する活性値の割合）を調べた。結果を表 2 に示す。

【0 0 3 3】

【表 2】

| 緩衝液の種類 | pH | 残存活性 (%) |
|------------|------|----------|
| トリス塩酸 | 7. 5 | 2 2. 1 |
| リン酸カリウム | 6. 5 | 6 6. 2 |
| フタル酸水素カリウム | 6. 0 | 8 3. 2 |
| マレイン酸 | 6. 5 | 7 2. 1 |
| コハク酸 | 6. 0 | 8 0. 5 |

【0 0 3 4】

表 2 から、従来から汎用されている緩衝液であるリン酸カリウム緩衝液、トリス塩酸緩衝液に比べて、本発明における添加剤によれば、凍結乾燥を行って作製した酵素製品の安定性のほうが優れていることがわかる。

【0 0 3 5】

【発明の効果】

上記のように、本発明によれば、長期保存性の優れ、ブランク値の低い高性能なグルコースセンサを得ることができる。また、従来よりも安定性に優れたピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼ組成物を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の一実施例におけるグルコースセンサの反応層を除いた概略平面図である。

【図 2】

図 1 に示すグルコースセンサの要部の縦断面図である。

【図 3】

本発明の一実施例および一比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図 4】

本発明の一実施例および一比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図 5】

本発明の一実施例および一比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図 6】

本発明の一実施例および一比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図 7】

本発明の一実施例および一比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図 8】

本発明の一実施例および一比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図 9】

本発明の一実施例および一比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図 1 0】

本発明の一実施例および一比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図 1 1】

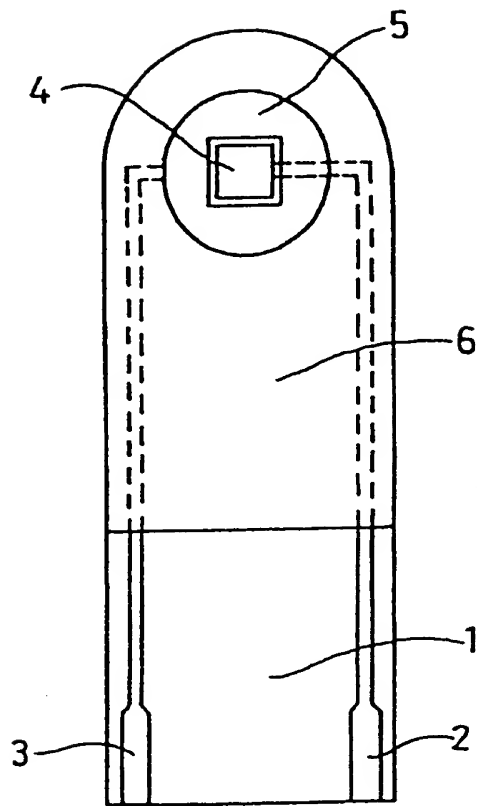
本発明の一実施例および一比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【符号の説明】

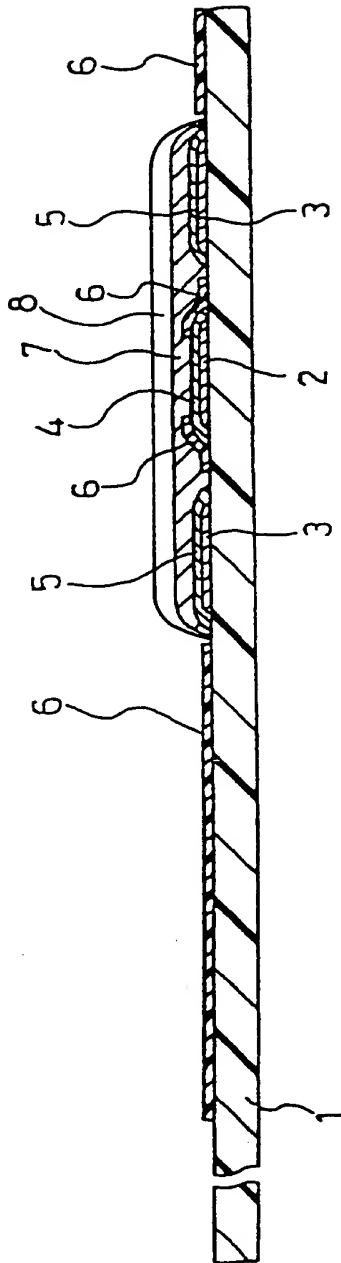
- 1 絶縁性基板
- 2、3 リード
- 4 作用極
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 CMC層
- 8 反応層

【書類名】 図面

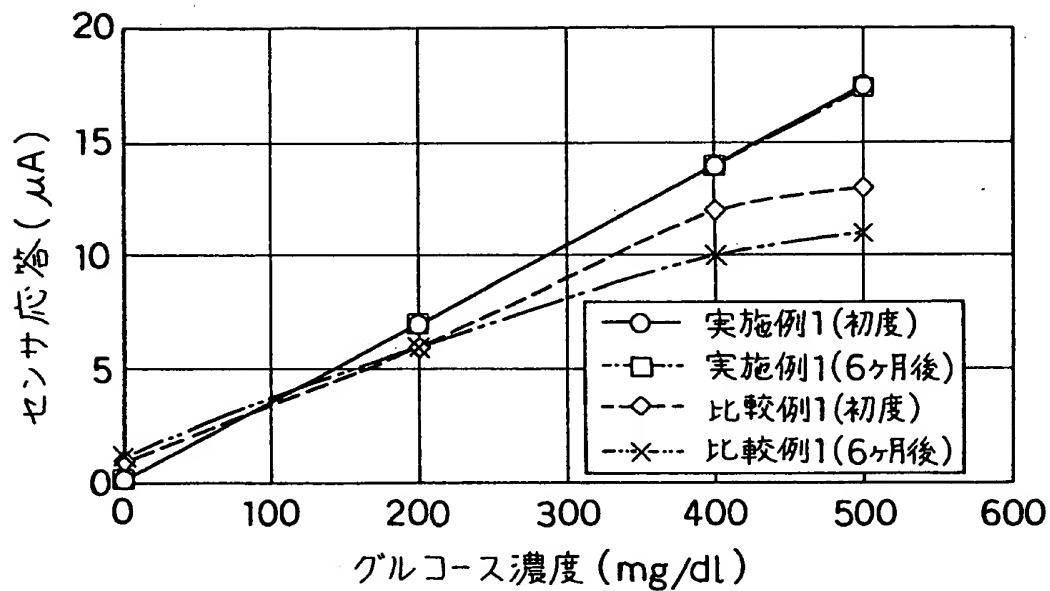
【図 1】



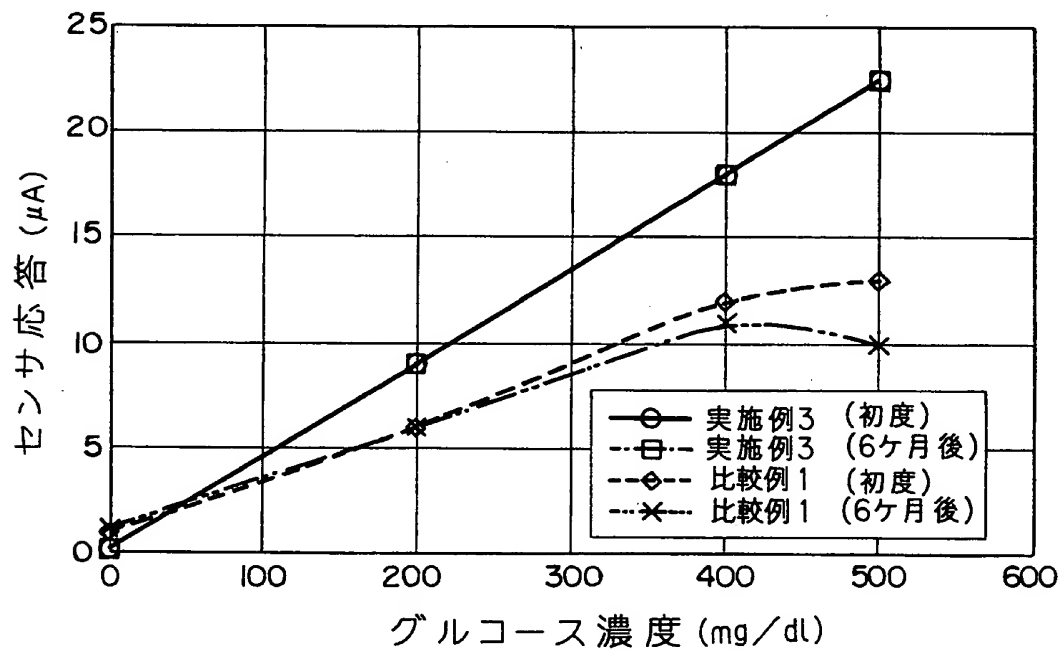
【図2】



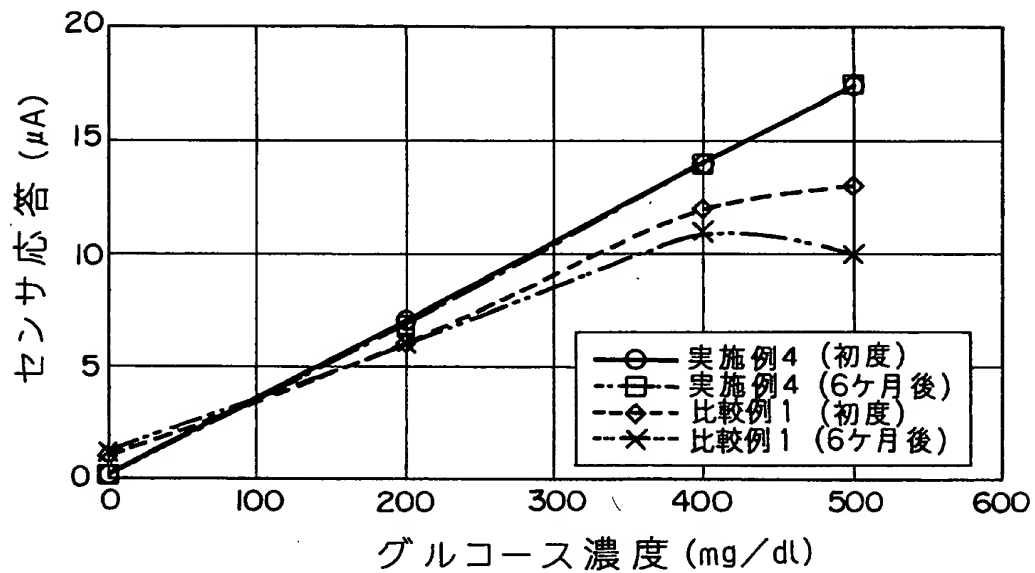
【図3】



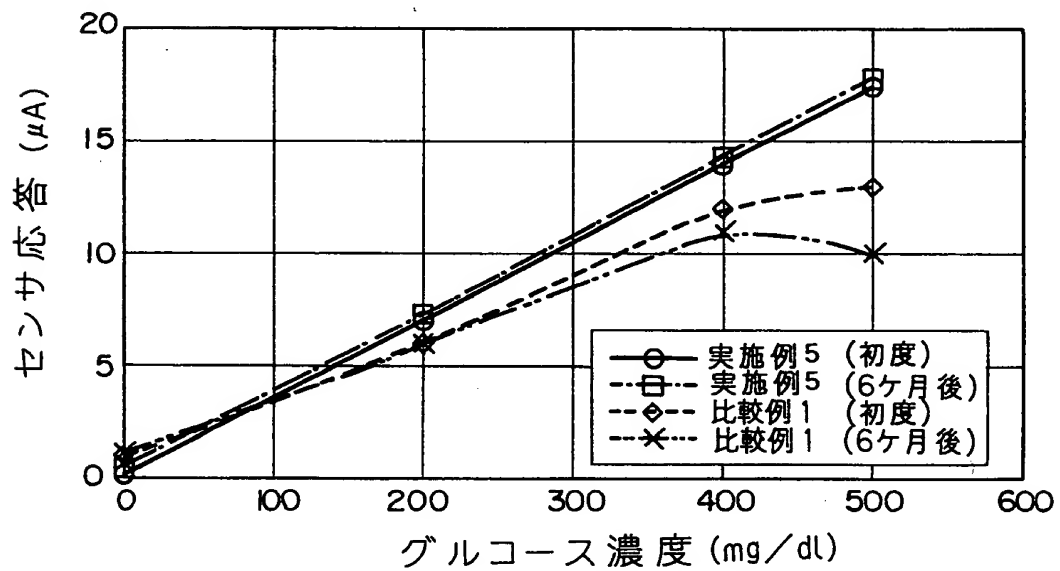
【図4】



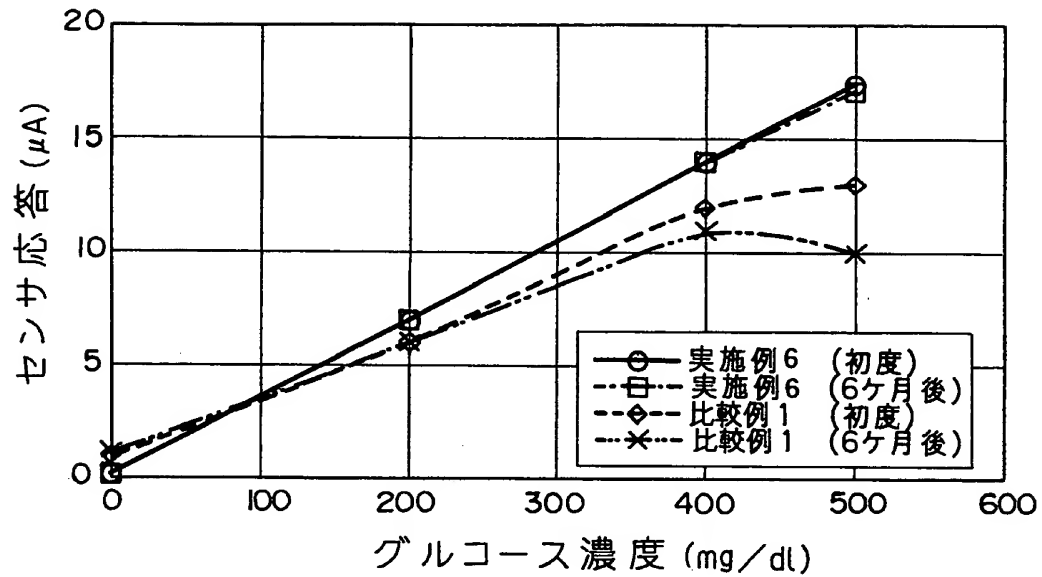
【図5】



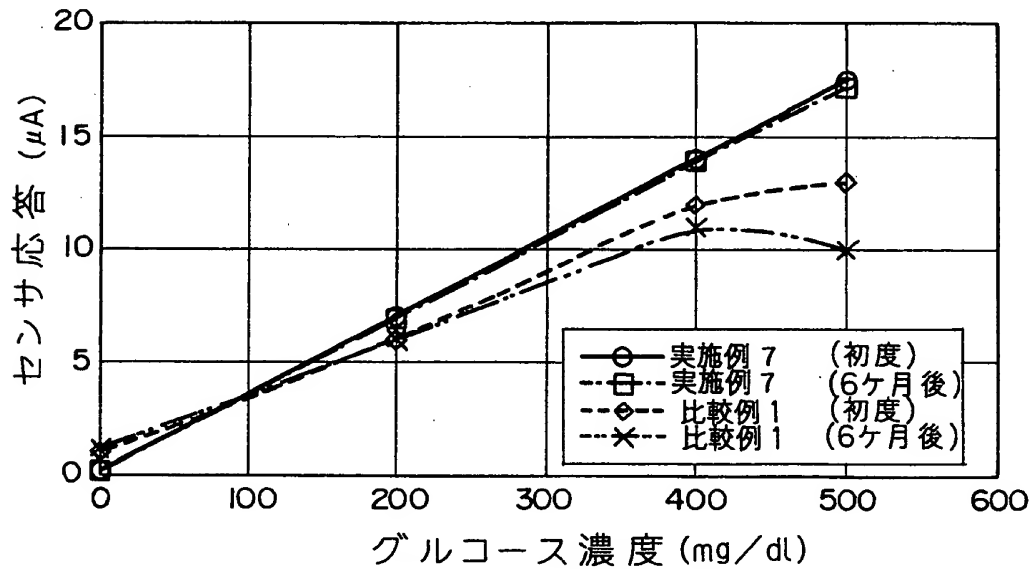
【図6】



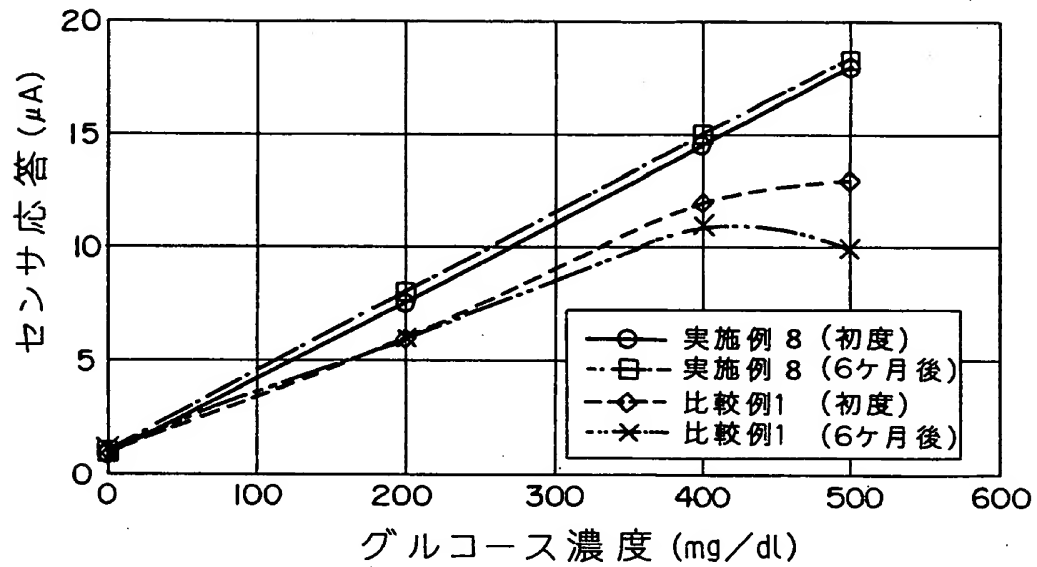
【図 7】



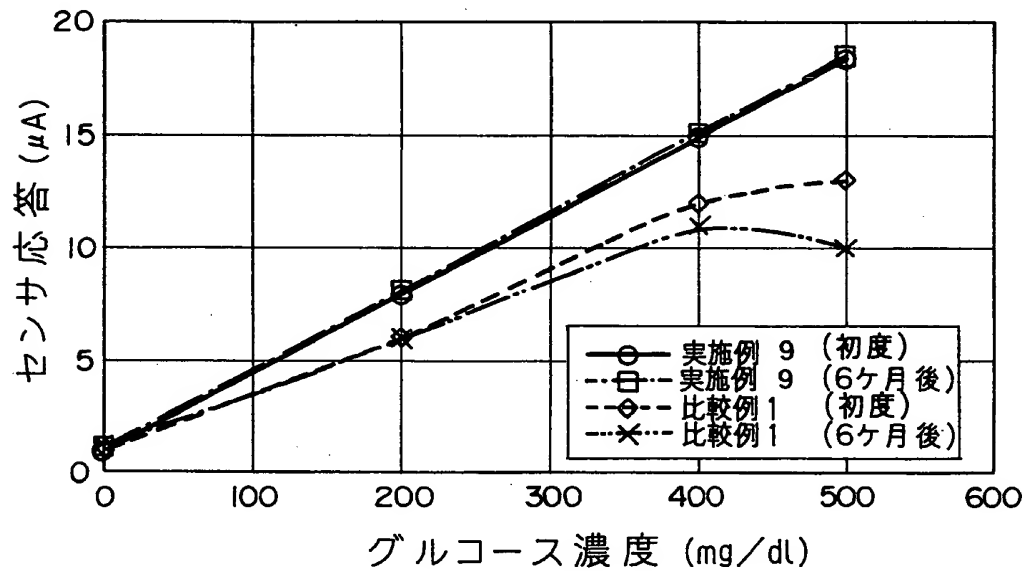
【図 8】



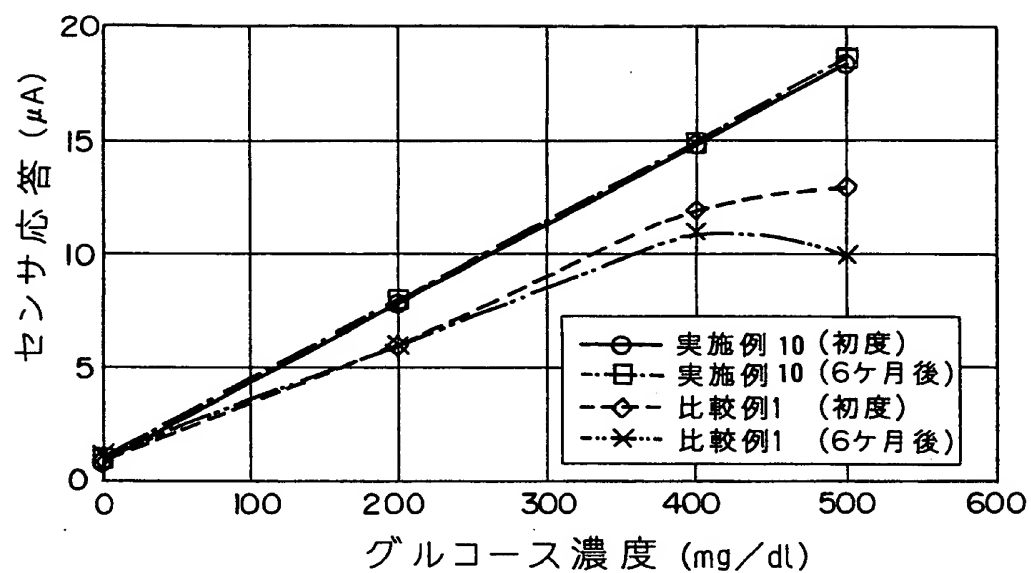
【図9】



【図10】



【図11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 保存安定性が高く、ブランク値の小さい高性能なグルコースセンサを提供する。

【解決手段】 電気絶縁性基板、前記基板上に設けられた電極系、および前記電極系に接してまたはその近傍に形成され、少なくともピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼを含む反応層を具備するグルコースセンサにおいて、前記反応層にフタル酸などの添加剤を添加する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

| | |
|---------|--------------------|
| 特許出願の番号 | 平成11年 特許願 第212703号 |
| 受付番号 | 59900720745 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第一担当上席 0090 |
| 作成日 | 平成11年 8月 2日 |

<認定情報・付加情報>

| | |
|-------|-------------|
| 【提出日】 | 平成11年 7月27日 |
|-------|-------------|

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005821]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
氏 名 松下電器産業株式会社